黑毛皮蠹线粒体基因组分析及皮蠹科系统发育分析

林爱丽，李欣欣，赵新成，宋　南*

（河南农业大学植物保护学院，郑州 450000）

摘要：【目的】分析黑毛皮蠹 *Attagenus unicolor japonicus* 的线粒体基因组结构及皮蠹科的系统发育。【方法】本研究利用下一代测序方法测定了黑毛皮蠹的近完全线粒体基因组序列，并基于 39 种昆虫的 *cox*1 基因序列，通过最大似然法和贝叶斯法构建了皮蠹科的系统发育树。【结果】黑毛皮蠹线粒体基因组包含 37 个基因（2 个 rRNA 基因，22 个 tRNA 基因，13 个蛋白质编码基因）和一段不完全的控制区，总长度为 14 793 bp（GenBank 登录号：MG017450）。基因排列顺序与已经发表的大多数昆虫线粒体基因组相同，不具有基因重排现象。13 个蛋白质编码基因中除 *nad*1 和 *nad*2 之外其他基因的起始密码子均是典型的 ATN，而 *nad*1 和 *nad*2 推断的起始密码子是 TTG；除 *cox*2，*nad*5 及 *nad*6 基因终止密码子为不完全的终止密码子 T 外，其他蛋白质编码基因的终止密码子是典型的 TAA 或 TAG。除了 *trnS*1 之外，所有的 tRNAs 均可形成典型的三叶草结构，*trnS*1 缺少 DHU 臂而形成了一个简单的环，不能形成稳定的三叶草结构。*trnS*1 的反密码子变成了 UCU，而不是更常见的 GCU。16S rRNA 的二级结构包括 5 个结构域（第 Ⅰ，Ⅱ，Ⅳ，Ⅴ和Ⅵ结构域），第Ⅲ结构域普遍缺失而变成一条单一的核苷酸链连接第Ⅱ和第Ⅳ结构域，共 44 个螺旋。12S rRNA 的二级结构包括 4 个结构域，共 27 个螺旋，其中螺旋 H47 序列变异性较高，由一个长茎和一个大环组成。系统发育分析结果显示，皮蠹科内亚科级别的系统发育关系为：((长皮蠹亚科(Megatominae)+毛皮蠹亚科(Attageninae))+皮蠹亚科(Dermestinae))。【结论】皮蠹亚科(Dermestinae)、皮蠹属 *Dermestes* 及圆皮蠹属 *Anthrenus* 均为单系群，斑皮蠹属 *Trogoderma* 为多系群。皮蠹亚科 Dermestinae 和皮蠹科剩余的类群构成姐妹群。

关键词：皮蠹科；黑毛皮蠹；rRNA；二级结构；线粒体基因组；系统发育

中图分类号：Q969　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2018)04-0477-11

Analysis of the mitochondrial genome of *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae) and a phylogenetic analysis of Dermestidae

LIN Ai-Li, LI Xin-Xin, ZHAO Xin-Cheng, SONG Nan* (College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract:【Aim】To analyze the mitochondrial genome of *Attagenus unicolor japonicas* and the phylogeny of Dermestidae.【Methods】The nearly complete mitochondrial genome of *A. unicolor japonicus* was sequenced by next-generation sequencing (NGS) method, and the phylogenetic trees were constructed using maximum likelihood method and Bayesian inference based on *cox*1 gene sequences of 39 insect species.【Results】The mitochondrial genome of *A. unicolor japonicus* contains 37 genes (2 ribosomal RNA genes, 22 tRNA genes and 13 protein-coding genes) and a partial control region, with the length of 14 793 bp (GenBank accession no.: MG017450). No gene rearrangement occurs in the genome

基金项目：国家自然科学基金项目(31402002)

作者简介：林爱丽，女，1993 年 1 月生，河南商丘人，硕士研究生，研究方向为基于线粒体基因组的昆虫系统发生研究，E-mail：18137792217@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: songnan@henau.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-11-18；接受日期 Accepted: 2018-02-13

organization of this insect, like most Coleoptera mitogenomes published. All protein-coding genes have typical start codon ATN except for *nad*1 and *nad*2, which start with the putative start codon TTG. *cox*2, *nad*5 and *nad*6 genes adjacent to the tRNAs terminate with T, while the other protein-coding genes stop with the typical stop codon TAA/TAG. The secondary structures of all tRNAs are of typical cloverleaf structure, except that of *trnS*1, in which the dihydrouracil arm (DHU arm) can not form a stable stem-loop structure but forms a simple loop. In addition, the anticodon for *trnS*1 is UCU rather than the usual GCU. The secondary structure of 16S rRNA contains five domains (domain Ⅰ, Ⅱ, Ⅳ, Ⅴ and Ⅵ) but lacks domain Ⅲ, with 44 helixes in total. The secondary structure of 12S rRNA consists of four domains and 27 helixes. The helix H47 is a highly variable region, which composes of a long stem and a big loop. The results of phylogenetic analysis showed that the relationship of Dermestidae subfamilies is ((Megatominae + Attageninae) + Dermestinae). 【Conclusion】Dermestinae, *Dermestes* and *Anthrenus* are all monophyletic, while *Trogoderma* is polyphyletic. *Dermestes* is a sister group to the rest of Dermestidae.

Key words: Dermestidae; *Attagenus unicolor japonicus*; rRNA; secondary structure; mitochondrial genome; phylogeny

皮蠹科(Dermestidae)是鞘翅目长蠹总科中的一个重要的具有检疫意义的储藏物害虫类群(Lawrence and Britton, 1991; Kiselyova and Mchugh, 2006; Bocak *et al*., 2014),有 6 个亚科:皮蠹亚科(Dermestinae)、圆胸皮蠹亚科(Thorictinae)、光皮蠹亚科(Orphilinae)、鬃皮蠹亚科(Trinodinae)、毛皮蠹亚科(Attageninae)、长皮蠹亚科(Megatominae)(Bouchard *et al*., 2011),共 34 个属,大约 1 000 种(Mroczkowski, 1968; Beal, 1991; Hava, 2003),我国已知有 8 属 40 余种。

皮蠹科昆虫分布较广,食性复杂,主要危害动物尸体、各种药材、毛织服装类、皮张等储藏物(赵养昌等, 1966; 张生芳等, 2007, 2008),因此对皮蠹科昆虫的系统发育学研究从经济角度具有重要意义。昆虫的线粒体基因组是一个环状闭合的双链 DNA 分子,一般包含 37 个基因——13 个蛋白质编码基因(*cox*1, *cox*2, *cox*3, *cytb*, *atp*6, *atp*8, *nad*1, *nad*2, *nad*3, *nad*4, *nad4L*, *nad*5 和 *nad*6)、22 个转运 RNA (tRNA)基因和 2 个核糖体 RNA(12S rRNA 和 16S rRNA)基因,还有一段控制区(control region, CR),由于 A/T 碱基含量较高,也叫做 A + T 富含区。

近年来,对皮蠹科的研究较少,主要集中在依据传统形态特征和分子数据进行分类鉴定及利用形态特征进行系统发育研究(Kiselyova and Mchugh, 2006; 张生芳等, 2007; 马骏等, 2009; 刘聪等, 2012; 邓海娟等, 2014; 周萍等, 2015)。目前(截止到 2017 年 9 月)GenBank 上已提交的皮蠹科的线粒体基因组仅 4 个,而且均为不完全的线粒体基因组,已提交的单个 *cox*1 基因虽然有 507 个,但也是不全的基因片段且重复较多。本研究测定了皮蠹科黑毛皮蠹 *Attagenus unicolor japonicus* 近线粒体全基因组,并对线粒体基因组进行了全面分析,基于 NCBI 上已有的 *cox*1 基因 5′端序列进行了皮蠹科系统发育分析,为皮蠹科的分类情况及皮蠹科的线粒体基因组研究提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 标本采集和 DNA 提取

黑毛皮蠹标本在 2015 年 5 月采集于河南省信阳鸡公山自然保护区,然后浸泡在无水乙醇中 -20℃保存。根据天根公司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit)步骤提取黑毛皮蠹昆虫的足和前胸背板的肌肉获得总 DNA。

1.2 线粒体基因组的获得

将提取的黑毛皮蠹总 DNA 利用紫外分光光度计及 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行浓度检测和纯度检测,检测合格后送与上海欧易公司利用 Illumina HiSeq2500 平台进行二代测序,共得到约 1 Gb 的双端测序长度为 150 bp 的片段,将得到的原始序列删除连接物、未配对的序列以及一些短的、质量差的序列后,高质量的序列利用 SOAPdenovo-Trans(Xie *et al*., 2014)进行组装拼接。

1.3 线粒体基因组的拼接、矫正

我们根据组装得到的 contigs 利用 Bioedit 7.0.5.3

版本(Hall, 1999)进行本地建库,然后利用 GenBank 上已提交的鞘翅目皮蠹科线粒体基因组的 *cox*1, 12S rRNA 和 *cytb* 序列进行搜索比对,接着把确认为线粒体基因组的 3 条序列上传至 Mitos(Bernt *et al.*, 2013)进行注释分析,将 Mitos 分析确定的线粒体基因组利用 NCBI Blast(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)和 BOLD 数据库(http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)进行分子鉴定,鉴定结果确定是皮蠹科毛皮蠹亚科毛皮蠹属昆虫,从而验证了传统形态鉴定(祝长清等, 1999)。

根据 GenBank 中已有的皮蠹科的线粒体基因组将 Mitos 注释过的黑毛皮蠹的线粒体基因组所有基因位点进行手动矫正,其中蛋白质编码基因利用 MEGA 5.0(Tamura *et al.*, 2011)进行翻译比对,确定基因正确起始、终止位点;tRNAs 和 rRNAs 利用 MAFFT Version 7 在线软件(https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/)进行比对,最终确定每个基因的正确起始、终止位点。从组装分析结果来看,仅控制区不完整。

1.4　线粒体基因组分析

本研究利用 OAGRAW Version 1.1(http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de/cgi-bin/ogdraw.pl)软件绘制了黑毛皮蠹的线粒体基因组结构图。

利用 MEGA 5.0(Tamura *et al.*, 2011)对黑毛皮蠹线粒体基因组的 13 个蛋白质编码基因进行了碱基组成、密码子使用情况及密码子使用频率分析。22 个 tRNA 二级结构依据 Mitos 分析结果进行绘制。黑毛皮蠹的 12S rRNA 和 16S rRNA 的二级结构依据西方蜜蜂 *Apis mellifera*(Gillespie *et al.*, 2006)和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*(Kobayashi and Okada, 1990)的 rRNAs 的二级结构模型进行绘制。

1.5　系统发育分析

1.5.1　*cox*1 矩阵碱基替换饱和性检测:本研究利用 DAMBE(Xia, 2013)选择无脊椎动物线粒体 DNA(invertebrate mitochondrial DNA, InvMtDNA)第 5 套密码子表对 *cox*1 核苷酸序列进行核苷酸替代饱和性分析。

1.5.2　系统发育树构建:该研究基于已测得黑毛皮蠹线粒体基因组中 *cox*1 序列结合 GenBank 中已有 *cox*1 的 5′端序列(长度约 700 bp)39 个(涉及 34 个皮蠹科物种及作为外群的 5 个窃蠹科物种)组成的矩阵利用最大似然法和贝叶斯法进行系统发育构建。*cox*1 数据集利用 MEGA 5.0(Tamura *et al.*, 2011)进行比对。该研究利用 IQ-TREE(Nguyen *et al.*, 2015)网上服务器(http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/)基于 *cox*1 组成的核苷酸序列矩阵进行最大似然法分析,模型为 GTR,构建了系统发育树 ML-cox1DNA,系统发育树的节点支持率由自举检验置信度(3 000 次重复)进行评估。该研究利用 CIPRES Science Gateway (http://www.phylo.org/)网上服务器中的 Mrbayes 3.2.6 工具构建了贝叶斯树 BI-cox1DNA,其参数如下:lset nst = 6, rates = invgamma, mcmcp ngen = 10 000 000, relburnin = yes, burninfrac = 0.25, printfreq = 1 000, samplefreq = 1 000, nruns = 2, nchains = 4, savebrlens = yes。节点支持率由贝叶斯后验概率(Bayesian posterior probabilities, PP)表示。

2　结果

2.1　线粒体基因组结构

黑毛皮蠹的线粒体基因组长度为 14 793 bp,其中 A+T 含量为 72.38%,G+C 含量为 27.62%,共包含 37 个基因和一段控制区,但控制区不完整,仅 178 bp,黑毛皮蠹线粒体基因组结构图如图 1 所示。黑毛皮蠹的线粒体基因组注释如表 1 所示,该线粒体基因组已提交至 NCBI 数据库,其登录号为 MG017450。

2.2　蛋白质编码基因分析

黑毛皮蠹的线粒体基因组中 13 个蛋白质编码基因总长度为 11 144 bp(仅计算 13 个蛋白质编码基因长度之和,不计基因间隔),A+T 含量为 71%,G+C 含量为 29%,其中 *nad*3, *nad*4, *nad4L*, *nad*5, *nad*6, *cox*1, *cox*2, *cox*3, *cytb*, *atp*8 和 *atp*6 基因的起始密码子均是典型的 ATN,而 *nad*2 和 *nad*1 基因的起始密码子是 TTG; *nad*1, *nad*2, *nad*3, *nad*4, *nad4L*, *cox*1, *cox*3, *atp*8 和 *atp*6 基因的终止密码子均是典型的 TAA 和 TAG,而 *cox*2, *nad*5 和 *nad*6 都是以 T 结尾。13 个蛋白质编码基因序列的氨基酸使用情况中,亮氨酸(Leu)、丝氨酸(Ser)、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)使用频率较高,平均比例依次为 13.845%, 9.492%, 9.951% 和 9.355%。半胱氨酸(Cys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、天冬氨酸(Asp)使用较低,平均比例依次为 1.082%, 1.514%, 1.839% 和 1.812%。*atp*8 中出现的氨基酸种类最少,半胱氨酸(Cys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、

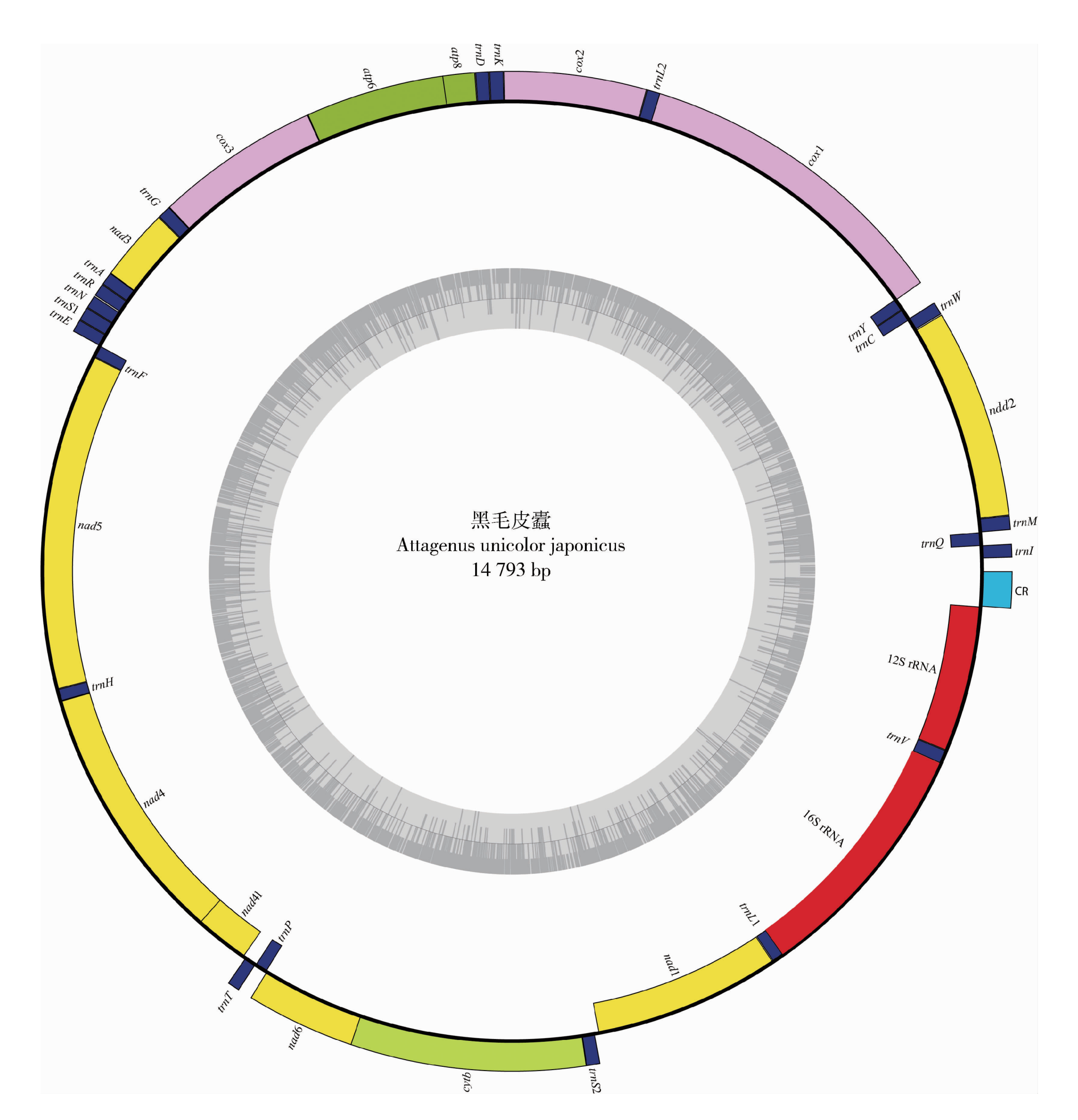


图 1 黑毛皮蠹线粒体基因组结构图

Fig. 1 Mitochondrial genome structure of *Attagenus unicolor japonicus*

加粗线条外侧表示基因方向为顺时针，内侧表示基因方向为逆时针。The outer circle represents genes on the heavy strand (clockwise), while the inner circle represents genes on the light strand (counterclockwise).

甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)和精氨酸(Arg)都未出现，*cox*1, *nad4L*, *nad*1 和 *nad*6 序列中出现氨基酸种类约 18 种，剩余蛋白质编码基因序列中出现的氨基酸种类均是 20 种。13 个蛋白质编码基因序列的密码子使用情况如表 2 所示。

2.3 tRNA 基因分析

黑毛皮蠹的线粒体基因组中 22 个 tRNA 基因总长度为 1 435 bp(仅计算 22 个 tRNA 基因长度之和，不计基因重叠)，A + T 含量为 74.56%，G + C 含量为 25.44%，其二级结构中除 *trnS*1 之外所有的 tRNAs 均是典型的三叶草结构，*trnS*1 缺少 DHU 臂而形成了一个简单的环，不能形成稳定的三叶草结构。另外，*trnS*1 的反密码子变成了 UCU，而不是更常见的 GCU。碱基配对中除了典型的 Waston-Crick 配对 A – U、G – C 外，G · U 配对也是存在的，称之为非典型配对，也称为摆动配对(wobble base pairs)。在 22 个 tRNAs 的二级结构中，出现一些碱基错配及非规范配对现象。*trnM* 中出现了 AC 碱基对错配情况，*trnW* 出现 AG 碱基对错配情况，*trnL*1, *trnL*2, *trnT*, *trnF* 和 *trnV* 出现 UU 碱基对错配情况，*trnC*, *trnY*, *trnG*, *trnA*, *trnS*1, *trnH*, *trnP*, *trnF* 及 *trnL*1 出现非规范性碱基对 G · U。

表 1　黑毛皮蠹线粒体基因组注释

Table 1　Annotation of the mitochondrial genome of *Attagenus unicolor japonicus*

基因 Gene	基因长度(bp) Gene length	起始位置(bp) Start position	终止位置(bp) Stop position	基因间隔(bp) Intergenic length	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	反密码子 Anticodon	编码链 Coding strand
trnI	65	65	129	−3			GAT	H
trnQ	69	127	195	−1			TTG	L
trnM	69	195	263	0			CAT	H
*nad*2	1 005	264	1 268	2	TTG	TAA		H
trnW	65	1 271	1 335	−8			TCA	H
trnC	63	1 328	1 390	0			GCA	L
trnY	64	1 391	1 454	−8			GTA	L
*cox*1	1 548	1 447	2 994	−5	ATT	TAA		H
*trnL*2	66	2 990	3 055	0			TAA	H
*cox*2	682	3 056	3 737	0	ATA	T		H
trnK	69	3 738	3 806	0			CTT	H
trnD	66	3 807	3 872	0			GTC	H
*atp*8	156	3 873	4 028	−7	ATC	TAA		H
*atp*6	669	4 022	4 690	−1	ATG	TAA		H
*cox*3	789	4 690	5 478	−1	ATG	TAA		H
trnG	66	5 478	5 543	0			TCC	H
*nad*3	351	5 544	5 894	−2	ATA	TAG		H
trnA	65	5 893	5 957	0			TGC	H
trnR	64	5 958	6 021	3			TCG	H
trnN	65	6 025	6 089	0			GTT	H
*trnS*1	67	6 090	6 156	0			TCT	H
trnE	63	6 157	6 219	−2			TTC	H
trnF	63	6 218	6 280	0			GAA	L
*nad*5	1 714	6 281	7 994	0	ATT	T		L
trnH	62	7 995	8 056	−1			GTG	L
*nad*4	1 332	8 056	9 387	−7	ATG	TAA		L
nad4L	282	9 381	9 662	10	ATA	TAA		L
trnT	62	9 673	9 734	0			TGT	H
trnP	64	9 735	9 798	1			TGG	L
*nad*6	525	9 800	10 324	−5	ATT	TAA		H
cytb	1 128	10 320	11 447	−2	ATT	TAA		H
*trnS*2	67	11 446	11 512	18			TGA	H
*nad*1	951	11 531	12 481	1	TTG	TAA		L
*trnL*1	61	12 483	12 543	0			TAG	L
16S rRNA	1 257	12 544	13 800	0				L
trnV	70	13 801	13 870	0			TAC	L
12S rRNA	745	13 871	14 615	0				L
Partial CR	178	14 616	14 793	64				非编码序列 Non-coding sequence

H：重链 Heavy strand；L：轻链 Light strand. T 表示不完全终止密码子，通常认为是转录后的 mRNA 的3′端的 A 补充为完整的终止密码子。“T” indicates the incomplete stop codon. It is generally assumed that TAA stop codon is completed by the addition of 3′ A to the mRNA.

表 2 黑毛皮蠹线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因的相对密码子使用频率

Table 2 Relative synonymous codon usage of 13 protein-coding genes of the mitochondrial genome of *Attagenus unicolor japonicus*

密码子 Codon	数量 Count	RSCU	密码子 Codon	数量 Count	RSCU	密码子 Codon	数量 Count	RSCU	密码子 Codon	数量 Count	RSCU
UUU(F)	314	1.48	UCU(S)	45	1.09	UAU(Y)	181	1.57	UGU(C)	43	1.32
UUC(F)	111	0.52	UCC(S)	33	0.80	UAC(Y)	50	0.43	UGC(C)	22	0.68
UUA(L)	154	1.96	UCA(S)	86	2.08	UAA(*)	135	1.32	UGA(W)	63	1.17
UUG(L)	83	1.06	UCG(S)	16	0.39	UAG(*)	69	0.68	UGG(W)	45	0.83
CUU(L)	93	1.18	CCU(P)	42	1.54	CAU(H)	60	1.45	CGU(R)	4	0.38
CUC(L)	32	0.41	CCC(P)	26	0.95	CAC(H)	23	0.55	CGC(R)	5	0.48
CUA(L)	77	0.98	CCA(P)	33	1.21	CAA(Q)	73	1.51	CGA(R)	22	2.10
CUG(L)	33	0.42	CCG(P)	8	0.29	CAG(Q)	24	0.49	CGG(R)	11	1.05
AUU(I)	243	1.57	ACU(T)	51	1.23	AAU(N)	152	1.46	AGU(S)	39	0.94
AUC(I)	66	0.43	ACC(T)	31	0.75	AAC(N)	56	0.54	AGC(S)	29	0.70
AUA(M)	134	1.48	ACA(T)	73	1.76	AAA(K)	108	1.58	AGA(S)	42	1.02
AUG(M)	47	0.52	ACG(T)	11	0.27	AAG(K)	29	0.42	AGG(S)	41	0.99
GUU(V)	64	1.63	GCU(A)	19	1.03	GAU(D)	58	1.51	GGU(G)	36	0.94
GUC(V)	21	0.54	GCC(A)	25	1.35	GAC(D)	19	0.49	GGC(G)	13	0.34
GUA(V)	55	1.40	GCA(A)	26	1.41	GAA(E)	61	1.45	GGA(G)	58	1.51
GUG(V)	17	0.43	GCG(A)	4	0.22	GAG(E)	23	0.55	GGG(G)	47	1.22

RSCU：相对密码子使用频率 Relative synonymous codon usage. * 终止密码子 Stop codon.

2.4 rRNA 基因分析

本研究依据西方蜜蜂 *A. mellifera*（Gillespie *et al.*, 2006）和黑腹果蝇 *D. melanogaster*（Kobayashi and Okada, 1990）的 rRNAs 的二级结构模型绘制了黑毛皮蠹的 12S rRNA 和 16S rRNA 的二级结构。12S rRNA 长度为 745 bp，位于 *trnV* 和控制区之间，A + T 含量为 75.30%，G + C 含量为 24.70%，其二级结构包括 4 个结构域（第 Ⅰ – Ⅳ 结构域），共 27 个螺旋，其中螺旋 H47 序列变异性较高，由一个长茎和一个大环组成。16S rRNA 长度为 1 257 bp，位于 *trnL*1 和 *trnV* 之间，A + T 含量为 78.28%，G + C 含量为 21.72%，其二级结构包括 5 个结构域（第 Ⅰ，Ⅱ，Ⅳ，Ⅴ 和 Ⅵ 结构域），第 Ⅲ 结构域普遍缺失而变成一条单一的核苷酸链连接第 Ⅱ 和第 Ⅳ 结构域，共 44 个螺旋。

2.5 *cox*1 数据集的系统发育信号检测

本研究利用 DAMBE（Xia, 2013）软件对 *cox*1 核苷酸序列进行核苷酸替代饱和性分析。结果如表 3 所示，39 个类群的 *cox*1 序列密码子第 3 位点出现饱和，第 1 位点和第 2 位点比较保守。

表 3 利用 DAMBE 检测 *cox*1 序列碱基替换饱和性

Table 3 Sequence saturation test of *cox*1 performed by DAMBE

数据集 Data base	NumOTU	*Iss*	*Iss. cSym*	*P*	*Iss. cAsym*	*P*
39taxa-cox1 序列的第 1 位点 39taxa-cox1_1	32	0.184	0.686	0.0000	0.367	0.0000
39taxa-cox1 序列的第 2 位点 39taxa-cox1_2	32	0.095	0.686	0.0000	0.367	0.0000
39taxa-cox1 序列的第 3 位点 39taxa-cox1_3	32	**0.744**	**0.686**	0.0578	**0.367**	0.0000
39taxa-cox1 序列的第 1 和 2 位点 39taxa-cox1_1 + 2	32	0.134	0.695	0.0000	0.367	0.0000
39taxa-cox1 的核苷酸全序列 39taxa-cox1_1 + 2 + 3	32	0.290	0.718	0.0000	0.392	0.0000

NumOTU：可操作分类单元数量 Number of operational taxonomic units；*P*：概率 Probability；*Iss*：替换饱和指数 Index of substitution saturation；*Iss. cSym*：假设拓扑结构对称 *Iss. c* assuming a symmetrical topology；*Iss. cAsym*：假设拓扑结构不对称 *Iss. c* assuming an asymmetrical topology. *Iss* < *Iss. c*：不饱和 None saturation；*Iss* > *Iss. c*：替换饱和 Substitution saturation. 出现饱和的数据加粗显示。Saturation data are indicated in bold.

2.6　系统发育分析

以窃蠹科作为外群，基于皮蠹科 34 个种的 *cox*1 基因的核苷酸序列矩阵利用最大似然法和贝叶斯法构建的系统发育树 ML-cox1DNA 和 BI-cox1DNA 如图 2 和 3 所示，两个系统发育树的拓扑结构大致相同。皮蠹科内亚科级别的系统发育关系为，((长皮蠹亚科(Megatominae)＋毛皮蠹亚科(Attageninae))＋皮蠹亚科(Dermestinae))。长皮蠹亚科(Megatominae)与毛皮蠹亚科构成姐妹群，节点支持率为 96。长皮蠹亚科(Megatominae)和毛皮蠹亚科(Attageninae)聚为一支，与皮蠹亚科(Dermestinae)构成姐妹群，节点支持率为 100。长皮蠹亚科(Megatominae)15 个物种主要聚为两大簇：圆皮蠹属 *Anthrenus* 为单系群，与 *Ctesias* 和球角圆皮蠹属 *Globicornis* 聚为一簇；斑皮蠹属 *Trogoderma* 为多系群，与 *Anthrenocerus* 和 *Reesa* 共聚为一簇。毛皮蠹亚科(Attageninae)9 个物种聚为一支，毛皮蠹属 *Attagenus* 为并系群。皮蠹亚科(Dermestinae)10 个物种聚为一支，皮蠹属 *Dermestes* 为单系群。

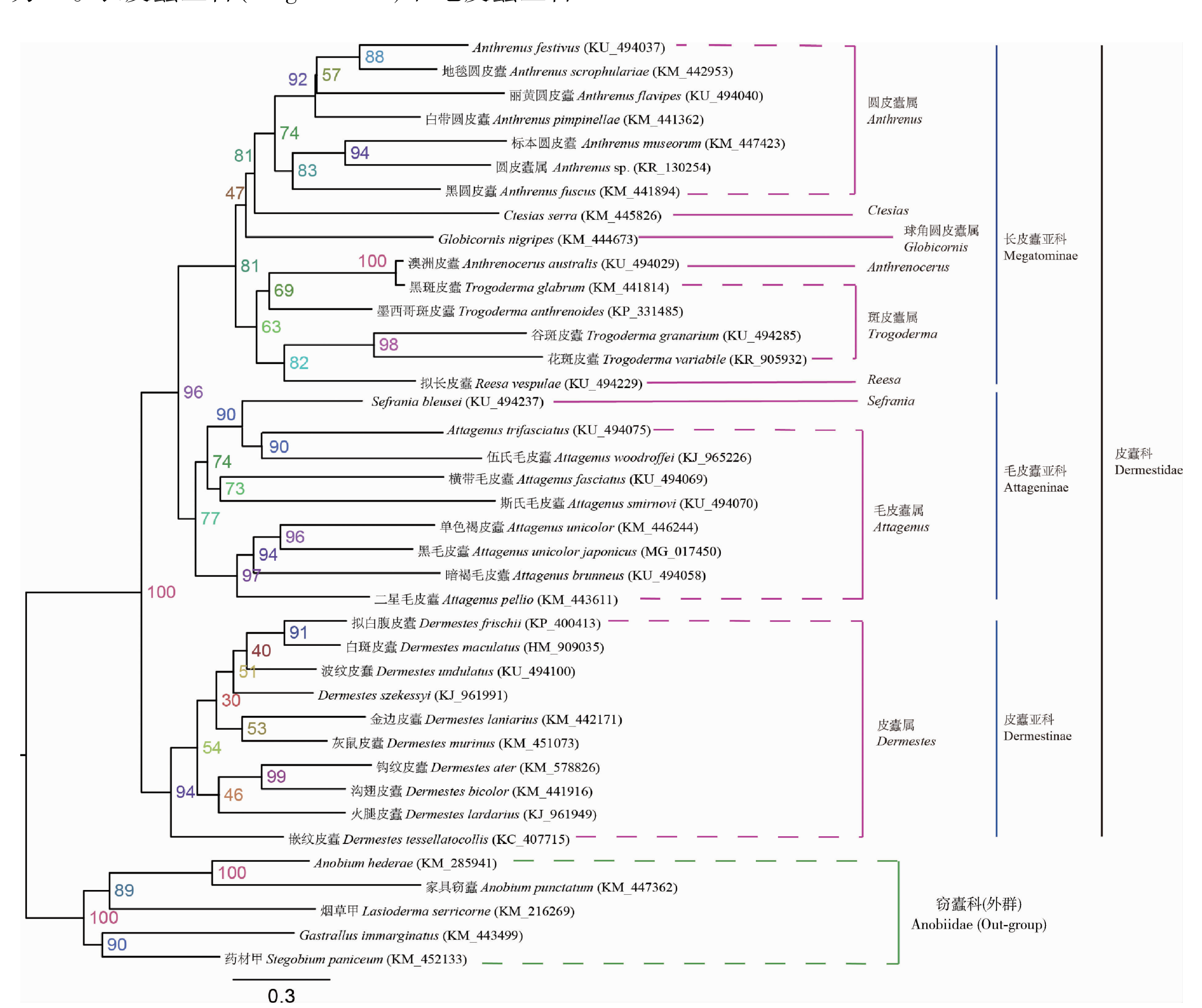


图 2　最大似然法构建的基于 39 个物种的 *cox*1 核苷酸序列的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of 39 species based on nucleotide sequence of *cox*1 using maximum likelihood method

节点旁数字代表 ML 树的支持率。Node numbers refer to bootstrap support values.

3　结论与讨论

3.1　线粒体基因组结构

黑毛皮蠹的线粒体基因组长度为 14 793 bp，包含 37 个基因和一段控制区，其线粒体基因组的方向及基因排列顺序都和假定同一祖先的不同昆虫的线粒体基因组完全一样(Boore, 1999)。黑毛皮蠹的线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因中，除 *cox*2，*nad*5 及 *nad*6 终止密码子以 T 结尾之外，所有蛋白

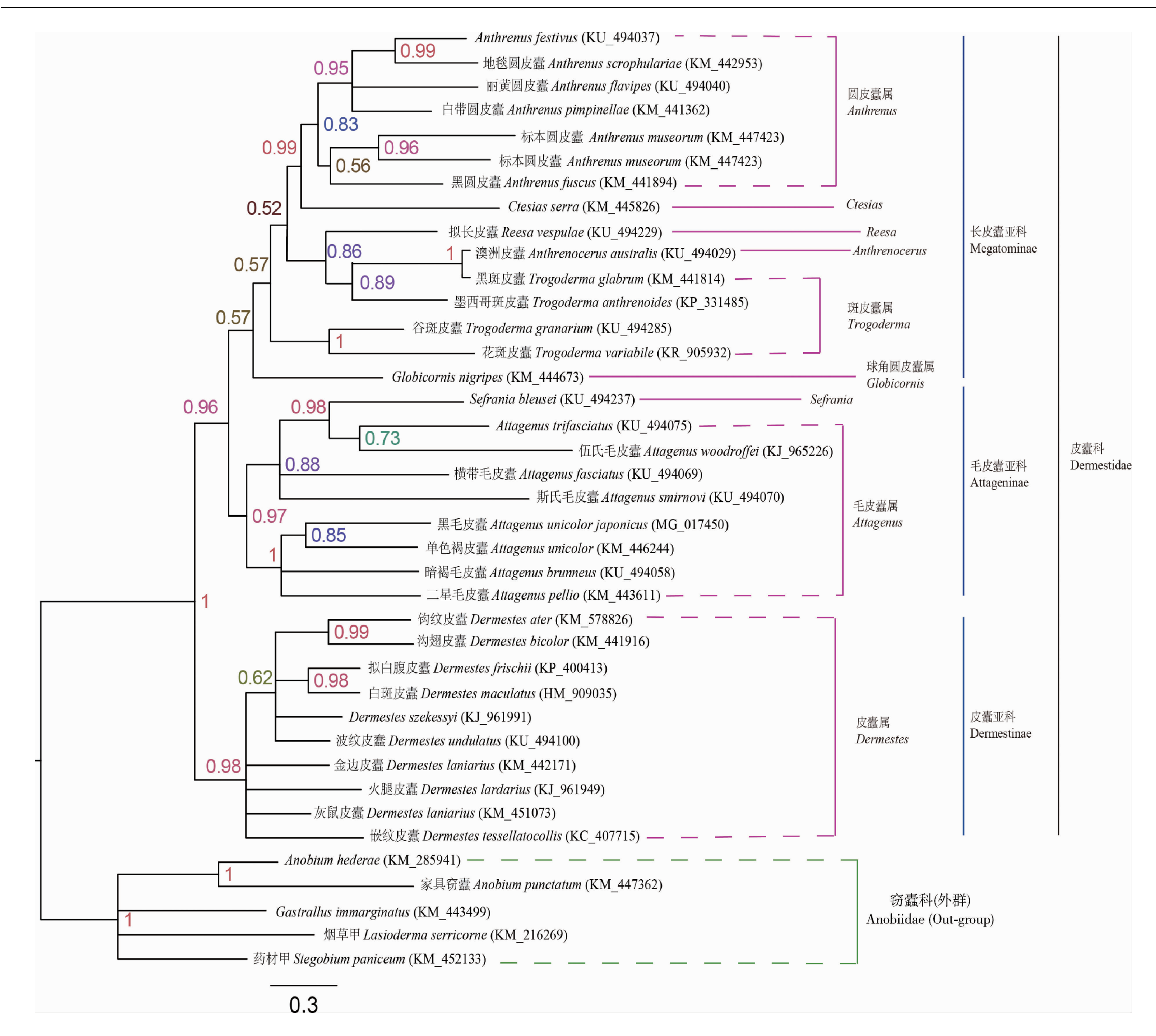


图 3 贝叶斯法构建的基于 39 个物种的 *cox*1 核苷酸序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 39 species based on nucleotide sequence of *cox*1 using Bayesian inference

节点旁数字代表 BI 树的后验概率。Node numbers refer to Bayesian posterior probabilities.

质编码基因的终止密码子均是典型的 TAA 和 TAG，通常认为是转录后的 mRNA 的 3′端的 A 补充为完整的终止密码子。

黑毛皮蠹的线粒体基因组 22 个 tRNA 基因中除了 *trnS*1 之外所均是典型的三叶草结构，*trnS*1 缺少 DHU 臂而形成了一个简单的环，不能形成稳定的三叶草结构，这在昆虫纲其他类群的昆虫中也出现过(Bae *et al*., 2004; Kim *et al*., 2005; Stewart and Beckenbach, 2005; Li *et al*., 2012; Sun *et al*., 2012; Wang *et al*., 2012; Wang and Tang, 2017)。另外，*trnS*1 的反密码子变成了 UCU 而不是更常见的 GCU，这种情况在鞘翅目甲虫研究中也有出现(Stewart and Beckenbach, 2003; Friedrich and Muquim, 2003; Sheffield *et al*., 2008; Wang *et al*., 2012)，Friedrich 和 Muquim(2003)认为 *trnS*1 的反密码子由 GCU 变为 UCU 在节肢动物的演化中多次出现的(Hickerson and Cunningham, 2000; Shao *et al*., 2001)。Sheffield 等(2008)研究表明，虽然节肢动物中 *trnS*1 的反密码子一般是 GCU，但保守的反密码子 UCU 在多食亚目中可能是一个共源性状。

黑毛皮蠹的 12S rRNA 二级结构中，螺旋 H47 序列变异性较高，不同模型的二级结构也不相同，黑毛皮蠹的螺旋 H47 结构由一个长茎和一个大环组成，这和 Gillespie 等(2006)绘制的西方蜜蜂 *A. mellifera* 的 12S rRNA 二级结构中的螺旋 H47 结构一致，但 Zhang 等(2016)描述的黄粉虫 *Tenebrio molitor* 的 12S rRNA 二级结构中的螺旋 H47 则是由 2 个长茎、1 个短茎和 3 个环组成。在 16S rRNA 二

级结构中包括 5 个结构域(第Ⅰ，Ⅱ，Ⅳ，Ⅴ和Ⅵ结构域)，第Ⅲ结构域通常缺失变成一条单一的核苷酸链将第Ⅱ结构域和第Ⅳ结构域连接到一起。

3.2　系统发育分析

根据最大似然法获得的 ML-cox1DNA 树和贝叶斯法获得的 BI-cox1DNA 树拓扑结构一致，系统发育分析结果表明皮蠹科是单系群。皮蠹科通常也被视为一个单系群(Lawrence and Newton，1982；Beutel，1996；Zhantiev，2000)，Kiselyova 和 Mchugh(2006)基于幼虫形态特征构建皮蠹科系统发育表明，皮蠹科中除去 *Orphilus* 后是单系群，但本研究 *cox*1 数据集中并未有 *Orphilus* 物种的数据参与。皮蠹科内亚科级别的系统发育关系：长皮蠹亚科(Megatominae)与毛皮蠹亚科(Attageninae)构成姐妹群，长皮蠹亚科(Megatominae)和毛皮蠹亚科(Attageninae)聚为一支与皮蠹亚科(Dermestinae)构成姐妹群。Zhantiev(2000)基于皮蠹科成虫、蛹及幼虫各阶段形态特征构建了皮蠹科系统进化树，该研究将皮蠹科分为 3 个亚科：皮蠹亚科(Dermestinae)、光皮蠹亚科(Orphilinae)及圆皮蠹亚科(Anthreninae)，Zhantiev(2000)系统进化树结果与本文系统发育结果几乎一致，都支持皮蠹亚科(Dermestinae)为单系群，且支持皮蠹亚科(Dermestinae)与皮蠹科剩余类群构成姐妹群。Kiselyova 和 Mchugh(2006)研究结果也表明皮蠹亚科(Dermestinae)与皮蠹科剩余类群构成姐妹群。但是由于 Zhantiev(2000)将皮蠹科分为 3 个亚科，毛皮蠹亚科(Attageninae)和长皮蠹亚科(Megatominae)在其系统发育结果中未有命名，但是从属的级别上来看，现在被划分为毛皮蠹亚科(Attageninae)和长皮蠹亚科(Megatominae)下的属也聚为一支，这点和本研究的系统发育树结果是一致的，但由于本研究取样仅包括 3 个亚科，长皮蠹亚科(Megatominae)和毛皮蠹亚科(Attageninae)构成姐妹群的关系还有待其他证据的补充和验证。本研究系统发育树的总体节点支持率较高，但个别节支位点支持率较低，原因可能是取样较少，有些属未取到样，有些属仅取一个种，这是由于皮蠹科物种中已有的 *cox*1 序列还不够全面；另外，一般情况下，越靠近树的根部节点支持率会降低，但本研究构建的系统发育树的根部节点支持率较高，分支底部反而降低，这是因为本研究选取的皮蠹科的 *cox*1 5′端序列部分物种序列一致性较高，但并不是序列一致性越高，其节点支持率就越高。当序列一致性过高时，其序列差异度更小，不易区分，这类序列与其他序列进行构建系统发育树的时候聚在一起的可能性会相同，其构建的系统发育树就会出现偏差，节点支持率也会降低。皮蠹亚科(Dermestinae)内的皮蠹属 *Dermestes* 及长皮蠹亚科(Megatominae)内的圆皮蠹属 *Anthrenus* 均是单系群，斑皮蠹属 *Trogoderma* 是多系群这一系列结论与 Kiselyova 和 Mchugh(2006)研究结果一致。

Castalanelli 等(2011)利用线粒体基因 *cox*1，*cytb* 和 18S rRNA 核基因对皮蠹科进行系统发育分析，结果表明斑皮蠹属 *Trogoderma* 是多系群，并估算皮蠹科的起源已经有 1.75 亿年。邓海娟等(2014)基于皮蠹科 3 属的线粒体基因组的 *cox*1 序列进行系统发育分析表明，线粒体基因组中的 *cox*1 基因可以作为分子水平上的依据进行皮蠹科昆虫生物系统发育分析。本研究虽然解释了皮蠹科中一部分类群的系统发育关系，但取样仍较少，且仅有部分 *cox*1 序列，分子依据较少。因此，未来的研究应该加大皮蠹科的取样物种数量和线粒体基因组的数量，利用更多数据去分析皮蠹科的系统发育及皮蠹科的分类地位。

参考文献(References)

Bae JS, Kim I, Sohn HD, Jin BR, 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Biol. Evol.*, 32(3): 978–985.

Beal RS, 1991. Dermestidae (Bostrichoidea) (including Thorictidae, Thylodriidae). In: Stehr FW ed. Immature Insects, Vol. 2. Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa. 434–439.

Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritzsch G, Pütz J, Middendorf M, Stadler PF, 2013. MITOS: improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 69(2): 313–319.

Beutel RG, 1996. Study of the larva of *Nosodendron fasciculare* (Olivier 1790) (Coleoptera: Nosodendridae) with implications for the phylogeny of Bostrichiformia. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 34(3): 121–134.

Bocak L, Barton C, Crampton-platt A, Chesters D, Ahrens D, Vogler AP, 2014. Building the Coleoptera tree-of-life for >8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Syst. Entomol.*, 39(1): 97–110.

Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27(8): 1767–1780.

Bouchard P, Bousquet Y, Davies AE, Alonso-Zarazaga MA, Lawrence JF, Lyal CH, Newton AF, Reid CA, Schmitt M, Ślipiński SA, Smith AB, 2011. Family-group names in Coleoptera (Insecta).

Zookeys, 88: 1 –972.

Castalanelli MA, Mikac KM, Baker AM, Munyard K, Grimm M, Groth DM, 2011. Multiple incursions and putative species revealed using a mitochondrial and nuclear phylogenetic approach to the *Trogoderma variabile* (Coleoptera: Dermestidae) trapping program in Australia. *Bull. Entomol. Res.*, 101(3): 333 –343.

Deng HJ, Zheng SZ, Gao Y, Chen YF, Zhao YL, Ge HL, Zhan GH, 2014. Phylogenetic study on three genera (Dermestidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase Ⅰ gene. *Jiangsu Agric. Sci.*, 42 (3): 23 –26. [邓海娟, 郑斯竹, 高渊, 陈云芳, 赵毓郎, 葛华林, 詹国辉, 2014. 基于 mtDNA COⅠ基因的皮蠹科三属的系统发育研究. 江苏农业科学, 42(3): 23 –26]

Friedrich M, Muquim N, 2003. Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castanaeum*. *Mol. Biol. Evol.*, 26(3): 502 –512.

Gillespie JJ, Johnston JS, Cannone JJ, Gutell RR, 2006. Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 657 –686.

Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41(41): 95 –98.

Hava J, 2003. World Catalogue of the Dermestidae (Coleoptera). Studie a Zpravy Oblastniho Muzea Praha-Vychod, Supplement 1. Brandys nad Labem, Prague. 1 –196.

Hickerson MJ, Cunningham CW, 2000. Dramatic mitochandrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, Anomura). *Mol. Biol. Evol.*, 17(4): 639 –644.

Kim I, Cha SY, Yoon MH, Hwang JS, Lee SM, Sohn HD, Jin BR, 2005. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the oriental mole cricket, *Gryllotalpa orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Gene*, 353(2): 155 – 168.

Kiselyova T, Mchugh JV, 2006. A phylogenetic study of Dermestidae (Coleoptera) based on larval morphology. *Syst. Entomol.*, 31(3): 469 –507.

Kobayashi S, Okada M, 1990. Complete cDNA sequence encoding mitochondrial large ribosomal RNA of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.*, 18(15): 4592.

Lawrence JF, Britton EB, 1991. Coleoptera (beetles). In: Naumann ID, Came PB, Lawrence JF, Nielsen ES, Spradbery JP, Taylor RW, Whitten MJ, Littlejohn MJ eds. The Insects of Australia: a Textbook for Students and Research Workers. 2nd ed. Division of Entomology, CSIRO, Australia. Melbourne University Press, Carlton, Victoria. 543 –683.

Lawrence JF, Newton AF, 1982. Evolution and classification of beetles. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 13(1): 261 –290.

Li H, Liu HY, Cao LM, Shi AM, Cai WZ, 2012. The complete mitochondrial genome of the damsel bug *Alloeorhynchus bakeri* (Hemiptera: Nabidae). *Int. J. Biol. Macromol.*, 8(1): 93 –107.

Liu C, Jiang X, Fan WJ, Wang XG, Lv YZ, Lin HJ, Liu EL, Xia LQ, Ban LP, 2012. Rapid molecular identification of *Trogoderma glabrum* and *Trogoderma variabile* (Coleoptera: Dermestidae). *J. Beijing Univ. Agric.*, 27(2): 27 –30. [刘聪, 蒋湘, 樊武疆, 王新国, 吕英姿, 林惠娇, 刘二龙, 夏来群, 班丽萍, 2012. 花斑皮蠹和黑斑皮蠹(鞘翅目: 皮蠹科)的快速分子鉴定. 北京农学院学报, 27(2): 27 –30]

Ma J, Hu XN, Liang F, Wang XG, Zhao JP, 2009. Molecular identification for *Trogoderma granarium* Everts and *Trogoderma glabrum* (Herbst). *Plant Quar.*, 23(4): 27 –28. [马骏, 胡学难, 梁帆, 王新国, 赵菊鹏, 2009. 谷斑皮蠹与黑斑皮蠹的分子鉴定. 植物检疫, 23(4): 27 –28]

Mroczkowski M, 1968. Distribution of the Dermestidae (Coleoptera) of the world with a catalogue of all known species. *Ann. Zool.*, 26 (3): 15 –191.

Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ, 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 32(1): 268 –274.

Shao R, Campbell NJ, Barker SC, 2001. Numerous gene rearrangements in the mitochondrial genome of the wallaby louse, *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera). *Mol. Biol. Evol.*, 18(5): 858 –865.

Sheffield NC, Song H, Cameron SL, Whiting MF, 2008. A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. *Mol. Biol. Evol.*, 25(11): 2499 –2509.

Stewart JB, Beckenbach AT, 2003. Phylogenetic and genomic analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of the spotted asparagus beetle *Crioceris duodecimpunctata*. *Mol. Biol. Evol.*, 26(3): 513 – 526.

Stewart JB, Beckenbach AT, 2005. Insect mitochondrial genomics: the complete mitochondrial genome sequence of the meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopoidae). *Genome*, 48(1): 46 –54.

Sun QQ, Sun XY, Wang XC, Gai YH, Hu J, Zhu CD, Hao JS, 2012. Complete sequence of the mitochondrial genome of the Japanese buff-tip moth, *Phalera flavescens* (Lepidoptera: Notodontidae). *Genet. Mol. Res.*, 11(4): 4213 –4225.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2371 –2739.

Wang CY, Feng Y, Chen XM, 2012. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of *Batocera lineolata* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae). *Entomology*, 57(27): 3578 –3585.

Wang QQ, Tang GH, 2017. Genomic and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of walnut leaf pest *Paleosepharia posticata* (Coleoptera: Chrysomeloidea). *J. Asia-Pac. Entomol.*, 20(3): 840 –853.

Xia X, 2013. DAMBE5: a comprehensive sofware package for data analysis in molecular biology and evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 30 (7): 1720 –1728.

Xie Y, Wu G, Tang J, Luo R, Patterson J, Liu S, Huang W, He G, Gu

S, Li S, Zhou X, Lam TW, Li Y, Xu X, Wong GK, Wang J, 2014. SOAPdenovo-Trans: *de novo* transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. *Bioinformatics*, 30(12): 1660－1666.

Zhang HL, Liu BB, Wang XY, Han ZP, Zhang DX, Su CN, 2016. Comparative mitogenomic analysis of species representing six subfamilies in the family Tenebrionidae. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(6): 841.

Zhang SF, Chen HJ, Xue GH, 2008. Coloured Illustrated Handbook of Storage Beetle. China Agricultural Scientech Press, Beijing. 20. [张生芳，陈洪俊，薛光华，2008. 储藏物甲虫彩色图鉴. 北京：中国农业科学技术出版社. 20]

Zhang SF, Liu HF, Guan W, 2007. The identification of larvae of eight important *Trogoderma* species. *Plant Quar.*, 21(5): 284－287. [张生芳，刘海峰，管维，2007. 8 种重要斑皮蠹属幼虫的鉴别. 植物检疫，21(5): 284－287]

Zhang SF, Liu YP, Wu ZQ, 1998. Storage Beetles in China. China Agricultural Scientech Press, Beijing. 100－101. [张生芳，刘永平，武增强，1998. 中国储藏物甲虫. 北京：中国农业科学技术出版社. 100－101]

Zhantiev RD, 2000. Classification and phylogeny of Dermestids (Coleoptera, Dermestidae). *Entomol. Rev.*, 80(9): 1115－1129.

Zhao YC, 1966. Storage Pests in China. Science Press, Beijing. 8－142. [赵养昌，1966. 中国仓库害虫. 北京：科学出版社. 8－142]

Zhou P, Feng CL, Wang XS, Feng YF, Liu Y, Ye BH, 2015. Larval morphology and molecular identification of three important pests of Dermestidae. *J. Plant Prot.*, 42(1): 51－58. [周萍，冯超伦，王兴胜，冯永飞，刘瑶，叶保华，2015. 三种重要皮蠹科害虫的幼虫形态与分子鉴定. 植物保护学报，42(1): 51－58]

Zhu CQ, Zhu DM, Yin XM, Shen XL, Zhou ST, Cao ZL, Chen GW, Wang GP, Li SJ, Bai XG, 1999. Insect Fauna of Henan, Coleoptera (1). Henan Science Technology Press, Zhengzhou. 126－143. [祝长清，朱东明，尹新明，沈祥林，周善田，曹宗亮，陈广文，王高平，李素娟，白旭光，1999. 河南昆虫志，鞘翅目(一). 郑州：河南科学技术出版社. 126－143]

（责任编辑：马丽萍）